



대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 특허출원 2001년 제 3285 호
Application Number PATENT-2001-0003285

출원년월일 : 2001년 01월 19일
Date of Application JAN 19, 2001

출원인 : 백기엽
Applicant(s) BEAK, GI-YE08

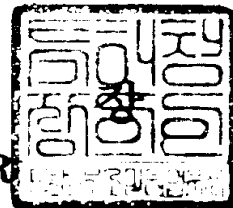
2001 년 11 월 26 일

특

허

청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0002
【제출일자】	2001.01.19
【발명의 명칭】	조직 배양에 의한 인삼, 장뇌삼, 산삼 부정근의 대 량 증식 방법
【발명의 영문명칭】	The method for mass production and proliferation of adventitious roots by plant tissue culture in ginseng
【출원인】	
【성명】	백기엽
【출원인코드】	4-1998-020740-5
【대리인】	
【성명】	홍성표
【대리인코드】	9-2000-000223-9
【포괄위임등록번호】	2001-003430-2
【대리인】	
【성명】	이선행
【대리인코드】	9-1998-000432-1
【포괄위임등록번호】	2001-003428-2
【대리인】	
【성명】	이현재
【대리인코드】	9-2000-000222-2
【포괄위임등록번호】	2001-003429-0
【발명자】	
【성명】	백기엽
【출원인코드】	4-1998-020740-5
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김윤수
【성명의 영문표기】	KIM, YUN SOO
【주민등록번호】	710318-1390717
【우편번호】	360-568

【주소】 충청북도 청주시 상당구 주중동 화인빌라 101동 311호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 유기원
【성명의 영문표기】 YU,KEE WON
【주민등록번호】 681210-1538714
【우편번호】 585-862
【주소】 전라북도 고창군 대산면 광대리 417.
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 김선자
【성명의 영문표기】 KIM,SUN JA
【주민등록번호】 760514-2721218
【우편번호】 390-150
【주소】 충청북도 제천시 화산1동 518.
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 한은주
【성명의 영문표기】 HAHN,EUN JOO
【주민등록번호】 641215-2037421
【우편번호】 361-201
【주소】 충청북도 청주시 흥덕구 분평동 분평주공아파트 515동 1306호
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
홍성표 (인) 대리인
이선행 (인) 대리인
이현재 (인)
【수수료】
【기본출원료】 14 면 29,000 원
【가산출원료】 0 면 0 원
【우선권주장료】 0 건 0 원

1020010003285

출력 일자: 2001/11/28

【심사청구료】	5 항	269,000 원
【합계】		298,000 원
【감면사유】	개인 (70%감면)	
【감면후 수수료】		89,400 원

【요약서】**【요약】**

본 발명은 조직 배양에 의한 인삼·장뇌삼·산삼 부정근의 대량 증식 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 인삼 및 재배삼, 장뇌삼, 산삼 등의 뿌리, 줄기, 잎 등의 조직을 배양하여 캘러스를 유기시키는 단계와,

상기 유기된 캘러스로부터 부정근을 발생시켜 증식시키는 단계와,

상기 증식시킨 부정근을 생물반응기 내에서 대량 배양하는 단계로 이루어지는 것을 특징으로 하는 조직 배양에 의한 인삼·장뇌삼·산삼 부정근의 대량 증식 방법에 관한 것이다.

따라서 환경, 토양 및 농약 오염과는 무관한 무공해 인삼을 실험실 또는 공장에서 연중 생산할 수 있으며 특히 소비자들에게 인식도가 높은 산삼을 규모화된 배양기에서 대량 생산함으로써 소비자의 소비 욕구를 충족시킬 수 있도록 한 것이다.

【색인어】

인삼, 장뇌삼, 산삼, 부정근, 생물반응기, 생장조절제

【명세서】**【발명의 명칭】**

조직 배양에 의한 인삼, 장뇌삼, 산삼 부정근의 대량 증식 방법{The method for mass production and proliferation of adventitious roots by plant tissue culture in ginseng}

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <1> 인삼은 식물학적으로 오가과(Araliaceae), 인삼속(Panax)에 속하는 식물로서 뿌리를 약용으로 이용한다.
- <2> 세계적으로 여기에 속하는 식물종은 6~7종이 알려지고 있으나 경제적으로 재배되어 인삼 시장에서 상품으로 유통되고 있는 인삼종은 크게 3가지 종류가 있다.
- <3> 지리적으로 아시아 극동지역에 분포, 재배되고 있는 'Panax ginseng C.A.Meyer'의 식물명을 가진 인삼은 전통적으로 중국의 한방생약 중 가장 중요한 강장약으로 이용되어왔다.
- <4> 인삼은 예로부터 여러가지 질병의 치료와 병의 회복 촉진에 놀라운 효험을 발휘하는 효능을 발휘해왔고 이러한 인삼의 효능에 대하여 인삼의 약효성분과 약리적 효능을 탐구하기 위하여 광범위한 연구를 계속하고 있으며 지금까지 과학적으로 밝혀진 대표적 효능으로는 신체 조절 기능의 항상성 유지 작용이라 할 수

있으며 이러한 작용에 근거하여 항피로 및 항스트레스 작용, 항당뇨작용, 혈압 조절 작용, 항암작용, 동맥경화 및 고혈압의 예방, 두뇌기능 강화, 위장기능 강화, 면역기능 강화, 항 바이러스 작용 등이 보고되고 있다.

<5> 이러한 인삼의 주요 유효 성분으로는 사포닌, 사포게닌, 폴리아세틸렌, 피라진 유도체, 말톨 등이 알려져 있다.

<6> 그러나 천연 약용 인삼은 배수가 양호하고 서늘한 고지에서 4~6년간에 걸쳐 장기간 재배되며 천연 기후에 영향을 받을 뿐만 아니라 동일 장소에서 연작이 불가능한 비경제적 생산 산물이다.

<7> 따라서 고가의 약용 인삼을 기후에 장애를 받지 않고 연중 대량 생산을 하기 위한 방법으로 식물 조직 배양 연구가 이루어져왔으며 천연 약용 인삼의 뿌리 조직을 배양하여 부정형의 세포괴인 캘러스를 얻고 이를 각종 영양 배지 및 환경 조건하에서 대량 배양하여 천연 약용 인삼과 동일한 유효 성분을 다량으로 함유한 인삼 조직물의 제조 연구가 행해지고 있으며, 국내에서도 특허 공개 번호 특1993-0000004의 인삼 모상근의 다량 증식 방법에 관한 기술이 특허화되어 있다

<8> 이와 같이 지금까지 고려 인삼, 미국 인삼, 전칠삼 등을 재료로 하여 다양한 목적으로 조직을 배양하는 기술은 일반화되어 있으며 특히, 인삼의 각 조직을 배양하여 획득한 캘러스로부터 증식, 기관 분화, 캘러스로부터 세포 배양 확립 등에 관해서는 전문학회지에 많은 보고가 이루어져 왔다.

<9> 그러나 이들 실험의 대부분은 캘러스 및 세포 증식에 미치는 물리적, 화학적 요인 분석에 관한 것이 대부분이었고 인삼의 부정근 배양에 관한 실험 결과는 거의 없는 실정이다.

<10> 또한 인삼을 이용하려면 재배지에서 5~6년간 재배하거나 최소한 3~4년간 재배해야 되는 등 시간과 노력이 많이 요구되며 연작장해의 결과도 있어 인삼 재배지의 확보가 문제시되고 있는 실정이며 식품류 및 화장품류, 약용 등의 목적으로 인삼의 수요량을 확보할 필요성이 대두되고 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<11> 본 발명은 상기의 사항들을 고려하여 안출한 것으로서, 본 발명의 목적은 인삼, 장뢰삼, 산삼 등의 부정근의 증식에 영향을 미치는 요인들을 규명하여 부정근의 성장을 극대화시킬 수 있고 성장조절기내에서 년중 생산 가능한 조직 배양에 의한 인삼·장뢰삼·산삼 부정근의 대량 증식 방법을 제공하는데 있다.

<12> 본 발명의 다른 목적은 부정근 대량 증식 방법을 장뢰삼 및 산삼과 같이 부가가치가 높은 제품에도 적용하여 식품 및 대체 의약품의 원료용으로써 대량 생산, 공급을 가능하게 하는 조직 배양에 의한 인삼·장뢰삼·산삼 부정근의 대량 증식 방법을 제공하는데 있다.

【발명의 구성 및 작용】

<13> 이와 같은 목적을 달성하기 위해서 본 발명에 따른 조직 배양에 의한 인삼·장뢰삼·산삼 부정근의 대량 증식 방법은 인삼 및 재배삼, 장뢰삼, 산삼 등의 뿌리, 줄기, 잎 등의 조직을 배양하여 캘러스를 유기시키는 단계와,

- <14> 상기 유기된 캘러스로부터 부정근을 발생시켜 증식시키는 단계와,
- <15> 상기 증식시킨 부정근을 생물반응기 내에서 대량 배양하는 단계로 이루어지는 것을 특징으로 하는 조직 배양에 의한 인삼·장뇌삼·산삼 부정근의 대량 증식 방법에 관한 것으로서, 환경, 토양 및 농약 오염과는 무관한 무공해 인삼을 실험실 또는 공장에서 연중 생산할 수 있으며 특히 소비자들에게 인식도가 높은 산삼을 규모화된 배양기에서 대량 생산함으로써 소비자의 소비 욕구를 충족시킬 수 있도록 한 것이다.
- <16> 이하 본 발명을 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- <17> 식물의 기관이나 세포 배양을 확립하여 상업화하기 위해서는 우선 기관이나 세포의 증식율이 높아야 한다. 이러한 증식율은 다양한 요인에 의해서 지배를 받는데, 증식율에 영향을 받는 가장 큰 요인은 생장 조절 물질로서 이는 종류나 용도에 따라 생장에 큰 영향을 미친다. 지금까지 세포나 캘러스 배양을 통해서는 통상적으로 4주 배양한 후 10배 이상의 증가는 매우 어렵다고 알려져 있으나 부정근을 배양했을 때 증식에 미치는 최적의 요인을 갖추어 주었을 경우 100배 이상의 생장도 기대할 수 있다.
- <18> 그러므로 본 발명에서는 1차적으로 부정근의 증식에 가장 큰 영향을 미치는 요인을 규명하고자 하였으며, 2차적으로 가장 효율적인 배지를 이용하여 생물반응기에 배양하고, 생물반응기의 형태 및 공기 주입량 등에 의해서 생장량이 좌우됨을 관찰하고 이를 개선하여 산업화시킬 수 있는 기술적 과제를 해결하고자 하였다.

- <19> 따라서 본 발명의 구체적인 기술은 다음의 내용으로 구성된다.
- <20> 인삼(*panax ginseng* C.A. Meyer), 장뇌삼, 산삼 중 어느 하나를 멸균 소독한 후 2~3mm의 절편으로 한 다음 2, 4-D(2,4-dichlorophenoxy acetic acid), Pochloram, NAA(naphthalemeacetic acid) 각각을 1.0~10.0mg/L의 양으로 첨가한 MS(Murashige-Skoog) 배지에 접종하고 캘러스를 유도하였으며, 그 중 각각 2.0mg/L로 첨가하였을 경우 가장 바람직한 효과를 나타내었다.
- <21> 상기 유도된 캘러스를 생장 조절제로서 2,4-D를 0.1~5.0mg/L 첨가한 MS 배지에서 증식시킨 다음 2~4주 간격으로 계대 배양하면서 IBA와 NAA중 1종을 1.0~5.0mg/L 양으로 첨가한 MS 배지에 옮겨 주며 부정근을 형성시켰다.
- <22> 이 때 캘러스 증식을 위해 사용되는 배지로서 MS 배지 외에 SH(Schenk and Hildebrandt) 배지, B5(Gamborg) 배지, LP(Quorin and lepoivre) 배지, White 배지 등을 사용하여 배양하였을 경우 효과는 거의 비슷하였으나 배양 기간에 따라 차이를 나타내었으며 이 중 MS 배지와 3/4 SH 배지에서 가장 바람직한 결과를 얻을 수 있었다. 또한 캘러스 생장에 영향을 미치는 생장조절제로서 NAA 또는 IBA를 각각 1.0~5.0mg/L로 첨가하는 경우도 바람직한 결과를 얻을 수 있는 것으로 나타났다.
- <23> 상기 형성된 부정근을 MS 배지에서 무기물 농도 1/2~3/4, pH 5.7~6.0, 당 농도 3~5%, 온도 18~24℃의 조건으로 증식시킨 다음 배양 절편체를 포함하여 새로 형성된 측근을 무작위로 1~2cm로 절단하여 공기 부양형 풍선형 생물반응기에 접종한 다음 온도 22℃, 공기주입량 0.05~0.3vvm로 하고, 설탕 3%를 첨가한

MS 배지에 생장 조절제로서 BSSA(benzo [b] selenienyl acetic acid), IBA, NAA 중 1종을 1.0~10.0mg/L의 양으로 첨가하여 pH 6.0에서 배양하였다.

<24> 이 때 2주 간격으로 공기 주입량을 증가시켜 뿌리의 엉김 현상을 방지해주는 것이 바람직하며 전체 생산량 감소를 방지하기 위해 생물반응기내에서의 부정근 배양 2주후 부정근을 재접종해 주는 것이 바람직하다.

<25> 이와 같이 배양이 완료된 부정근을 20~50ton 규모까지의 더 큰 생물반응기로 단계적으로 스케일 업하여 대량 생산을 가능하게 할 수 있다.

<26> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

<27> 본 발명에서는 포장에서 재배하고 있는 6년근 인삼, 15년생 장뇌삼, 100년 이상된 산삼을 구하여 하기의 실험에 사용하였다.

<28> [실시예 1] 부정근 증식의 최적 조건 선정 실험

<29> 캘러스로부터 부정근을 형성시킨 다음 이들 조각을 최단기간 내에 최대 증식되도록 조건을 갖추어 주는 것이 가장 효율적이고 생산비도 절감할 수 있는 방법이므로 다음과 같이 최적 조건을 규명하기 위한 실험을 실시하였다.

<30> IBA 2.0mg/L가 첨가된 MS 배지 30ml를 일회용 페트리디쉬에 분주한 후 산삼의 캘러스에서 유래된 부정근을 평균 10mm 길이로 잘라 30개씩 접종하였다.

<31> 배지의 무기물 농도를 1배, 1/2배, 3/4배로 하여 실험을 실시하였으며, 배지의 pH는 4.0, 5.0, 5.5, 5.7, 6.0, 6.5로 각각 구분하였고 배지의 당 농도는 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%로 구분하였으며 배양온도는 15℃, 18℃, 20℃, 22℃, 24℃, 26℃로 구분하여 증식 상황을 관찰하였다.

<32> 상기 실험 결과 무기물 농도 1/2~3/4, 배지 pH 5.7~6.0, 배지의 당 농도 3~5%, 배양 온도 18~24℃의 범위가 부정근 증식의 최적 조건인 것으로 나타났다.

<33> [실시에 2] 생장조절제 첨가가 부정근 증식에 미치는 영향

<34> MS 배지에 당을 3% 첨가하고 pH를 6.0으로 고정시킨 후 오옥신으로 IBA, NAA, BSAA 각각을 각각 1mg/L, 2mg/L, 3mg/L, 5mg/L씩 첨가하여 기본 배지를 만들고 이들 기본 배지를 1L 삼각 플라스크, 5L 생물 반응기에 각각 분주한 다음 산삼과 재배삼의 뿌리(평균 1.0cm 길이)를 접종하여 4주 후에 생장량을 조사하여 그 결과를 표 1에 나타내었다.

<35>

【표 1】

생장조절제 첨가가 부정근 증식에 미치는 영향

생장조절제(mg/L)		재배삼(생체중 증가율)	산삼(생체중 증가율)
대조구		1.7	1.5
IBA	1	4.5	4.3
	2	6.7	6.8
	3	6.5	5.7
	5	3.8	4.2
NAA	1	3.2	3.4
	2	7.2	6.8
	3	6.7	6.2
	5	4.2	3.8
BSAA	1	5.3	5.0
	2	13.2	12.5
	3	11.4	11.7
	5	4.8	3.9

<36> 표 1에서 알 수 있듯이 생장조절제를 처리하지 않은 배지에서는 2배 미만의 증가를 보이는데 비해서 IBA, NAA가 첨가된 배지에서는 5배 이상의 생체중 증가를 보였는데 2~3mg/L에서 가장 효과적인 결과를 나타내어 적정 농도임을 알 수 있었다. 한편 새로 합성된 오옥신인 BSSA를 첨가했을 경우에는 생체중이 현저히 증가하였고 그 적정 농도도 역시 2~3mg/L임을 알 수 있었다.

<37> 재배삼과 산삼의 생체중을 비교해 보면 생물반응기내에서는 재배삼, 산삼간의 증식율에 차이를 나타내지 않았고 생장 양상도 비슷하여 구별이 쉽지 않았다.

<38> 따라서 생물반응기내에서 인삼 부정근을 대량 증식하기 위해서는 NAA, IBA, BSSA와 같은 생장조절제의 첨가하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다.

<39> [실시에 3] 접종 방법이 부정근의 증식에 미치는 영향

<40> 생물 반응기에 산삼 및 재배삼의 부정근을 배양할 때 부정근의 조제 방법이 뿌리 증식에 미치는 영향을 규명하기 위하여 BSSA 2mg/L가 첨가된 MS 배지에 무절단 배양법, 절편체를 제외하고 측근만 배양하는 방법, 절편체 및 측근의 구분 없이 부정근의 길이를 1~2cm로 절단하여 배양하는 방법으로 구분하여 4주간 배양한 다음 그 결과를 표 2에 나타내었다.

<41> 【표 2】

부정근의 계대 방법이 생체중 증가에 미치는 영향(4주 배양)

배양방법	재배삼		산삼	
	생체중 증가	건물중 증가	생체중 증가	건물중 증가
무절단배양	1.4	-	1.5	-
측근만 잘라 배양	11.2	13.6	10.5	10.8
절편체 및 측근 구분 없이 1~2cm 절단배양	12.4	14.7	13.2	15.9

<42> 표 2의 결과에서 보듯이 절편체 배양에서 형성된 측근을 절편체와 함께 새로운 배지에 이식하였을 경우 측근의 발생이 이루어지지 않아 생체중 증가가 이루어지지 않았고 갈변화 현상이 발생하였다. 반면에 원래 절편체를 제거하고 형

성된 측근만 절단하여 배양하였을 경우 측근 발생수와 생체중이 증가하였으나 접종하는데 시간이 오래 걸려 효과적인 방법은 되지 못하였다.

<43> 그러나 배양 절편체를 포함하여 새로 형성된 측근을 무작위로 1~2cm 정도 절단하여 새로운 배지에 접종하였을 때의 증식율이 15배 이상으로 나타나 생체중의 증가에 가장 효과적인 것으로 나타났다. 따라서 절편체 및 측근의 구분 없이 부정근의 길이를 1~2cm로 절단하여 접종하는 것이 바람직하다.

<44> [실시에 4] 생물반응기 형태가 부정근 증식에 미치는 영향

<45> 대량 증식을 목적으로 생물반응기를 이용하여 배양을 실시할 경우 생물반응기의 형태에 따른 부정근의 증식 결과를 관찰하기 위해 파일렛 규모인 500 ℓ, 1000 ℓ의 공기 부양형 풍선행 생물반응기와 500 ℓ, 1000 ℓ의 공기 부양형 드럼형 생물반응기를 비교하여 배양 40일 후 생체중 증가에 미치는 효과를 비교하여 그 결과를 표 3에 나타내었다.

<46> 이 때 배양실의 온도는 22℃로 고정하였고 생물반응기 내 공기 주입량은 0.05~0.3vvm으로 하였으며, 배지는 설탕 3%를 첨가한 MS 배지를 사용하였고 생장 조절제로서 BSSA 2.0mg/L를 첨가하였고 pH는 6.0으로 조절하였다.

<47>

【표 3】

생물반응기의 형태가 산삼 부정근 증식에 미치는 효과(40일 배양)

배양기 형태	규모(ℓ)	초기 접종량(kg)	생체중(kg)	건물중(kg)
공기부양형 풍선행	500	2	88	6.5
	1000	3	185	12.4
공기부양형 드럼형	500	2	80	5.7
	1000	3	174	10.8

<48> 표 3의 결과에서 알 수 있듯이 전반적으로 드럼형보다는 공기 부양형 풍선행이 생체중 및 건물중 증가에 효과적이었는데 두 형태 모두 배양 시일이 경과함에 따라 부정근의 엉킴 현상이 발생하였으므로 2주 간격으로 공기 주입량을 증가시켜 뿌리의 엉킴 현상을 방지해주는 것이 바람직하며, 배양 4주 후 발생하는 부정근의 부유 현상으로 인한 전체 생산량 감소를 방지하기 위해서는 배양 2주 후 재접종(약 1kg) 해주는 것이 바람직하다.

<49> 또한 50ℓ, 100ℓ 규모의 씨드배양기 및 20~50ton 규모의 배양기를 가동하기 위한 전단계 배양기인 1~3ton 규모의 스케일업 배양기 안에는 모터를 이용한 칼날을 부착하여 더 큰 배양기로 옮기기 전 형성된 부정근을 상기 실시예 3의 방법으로 2~3cm 길이로 절단한 후 옮겨 주는 것이 바람직하다.

<50> 이상에서 본 바와 같이 본 발명에 따른 인삼·장뇌삼·산삼 부정근의 대량 증식 방법은 바이오메스의 생산 능력도 높고 취급하기도 편리하며 건물중이 증가되는 경향이 있는 획기적인 대량 생산 방법임을 확인할 수 있었다.

【발명의 효과】

<51> 상기한 바와 같이 이루어지는 본 발명에 의하면, 인삼·장뇌삼·산삼 부정근의 생물반응기 배양을 위한 증식 조건 중 적정 배지, 배지의 pH, 당농도, 배양 온도, 성장조절제의 종류 등과 같은 최적 증식 조건을 확립하고, 부정근의 접종 방법의 단순화 및 증식율과 생산성이 높은 생물반응기 형태를 확립함에 따라 지금까지 개발되지 않았던 인삼의 생물반응기내 부정근의 생산을 산업화하여 기후 및 환경 조건에 영향을 받지 않고 고부가가치의 인삼, 장뇌삼, 산삼 등을 년중 생산할 수 있으며 또한 다양한 수요층에 저렴한 가격으로 공급할 수 있게 하는 조직 배양에 의한 인삼·장뇌삼·산삼 부정근의 대량 증식 방법을 제공할 수 있다.

1020010003285

출력 일자: 2001/11/28

【특허 청구범위】**【청구항 1】**

인삼, 장뇌삼, 산삼 중 어느 하나를 멸균 소독한 후 2~3mm²의 절편으로 한 다음 2, 4-D(2,4-dichlorophenoxy acetic acid), Pochloram, NAA(naphthaleneacetic acid) 각각을 1.0~10.0mg/L의 양으로 첨가한 MS(Murashige-Skoog) 배지에 접종하고 캘러스를 유도하는 단계와,

상기 유도된 캘러스를 2,4-D를 0.1~5.0mg/L 첨가한 MS 배지에서 증식시킨 다음 2~4주 간격으로 계대 배양하면서 IBA, NAA중 어느 하나를 1.0~5.0mg/L의 양으로 첨가한 MS 배지에 옮겨 주며 부정근을 형성시키는 단계와,

상기 형성된 부정근을 MS 배지에서 증식시키는 단계와,

상기 증식시킨 부정근을 공기 부양형 풍선형 생물반응기에 접종하여 설탕 3%를 첨가한 MS 배지에 생장조절제로서 BSSA(benzo [b] selenienyl acetic acid) 1.0~10.0mg/L, IBA 1.0~10.0mg/L, NAA 1.0~10.0mg/L중 어느 하나를 첨가하여 배양하는 단계와,

상기 배양된 부정근을 더 큰 용량의 생물반응기로 스케일 업하여 대량 생산하는 단계로 구성되는 것을 특징으로 하는 조직 배양에 의한 인삼·장뇌삼·산삼 부정근의 대량 증식 방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서,

상기 형성된 부정근의 증식 조건은 무기물 농도는 $1/2 \sim 3/4$, pH 5.7~6.0, 당농도 3~5%, 온도 18~24℃인 것을 특징으로 하는 조직 배양에 의한 인삼·장뢰삼·산삼 부정근의 대량 증식 방법.

【청구항 3】

제 1항에 있어서,

상기 증식시킨 부정근을 생물반응기에 접종하는 방법은 배양 절편체를 포함하여 새로 형성된 측근을 무작위로 1~2cm로 절단하여 접종하는 것을 특징으로 하는 조직 배양에 의한 인삼·장뢰삼·산삼 부정근의 대량 증식 방법.

【청구항 4】

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 생물반응기내의 부정근 배양 조건은 온도 22℃, 공기주입량 0.05~0.3vvm, pH 6.0인 것을 특징으로 하는 조직 배양에 의한 인삼·장뢰삼·산삼 부정근의 대량 증식 방법.

【청구항 5】

제 1항에 있어서,

상기 부정근 배양 2주후 부정근을 재접종하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조직 배양에 의한 인삼·장뢰삼·산삼 부정근의 대량 증식 방법.

	【서지사항】
【서류명】	명세서 등 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.03.05
【출원인】	
【성명】	백기엽
【출원인코드】	4-1998-020740-5
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	홍성표
【대리인코드】	9-2000-000223-9
【포괄위임등록번호】	2001-003430-2
【대리인】	
【성명】	이선행
【대리인코드】	9-1998-000432-1
【포괄위임등록번호】	2001-003428-2
【대리인】	
【성명】	이현재
【대리인코드】	9-2000-000222-2
【포괄위임등록번호】	2001-003429-0
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2001-0003285
【출원일자】	2001.01.19
【심사청구일자】	2001.01.19
【발명의 명칭】	조직 배양에 의한 인삼, 장뇌삼, 산삼 부정근의 대 량 증식 방 법
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-01-0014208-99
【접수일자】	2001.01.19
【보정할 서류】	명세서등
【보정할 사항】	
【보정대상 항목】	별지와 같음
【보정방법】	별지와 같음
【보정내용】	별지와 같음

【취지】

특허법시행규칙 제13조의 규정에 의하여 위와 같이
제출합니다. 대리인

홍성표 (인) 대리인

이선행 (인) 대리인

이현재 (인)

【수수료】

【보정료】 0 원

【추가심사청구료】 0 원

【기타 수수료】 0 원

【합계】 0 원

【보정대상항목】 식별번호 20

【보정방법】 정정

【보정내용】

인삼(*panax ginseng* C.A. Meyer), 장뇌삼, 산삼 중 어느 하나를 멸균 소독한 후 2~3mm의 절편으로 한 다음 2, 4-D(2,4-dichlorophenoxy acetic acid), Pichloram, NAA(naphthalemeacetic acid) 각각을 1.0~10.0mg/L의 양으로 첨가한 MS(Murashige-Skoog) 배지에 접종하고 캘러스를 유도하였으며, 그 중 각각 2.0 mg/L로 첨가하였을 경우 가장 바람직한 효과를 나타내었다.

【보정대상항목】 식별번호 23

【보정방법】 정정

【보정내용】

상기 형성된 부정근을 MS 배지에서 무기물 농도 1/2~3/4, pH 5.7~6.0, 당 농도 3~5%, 온도 18~24℃의 조건으로 증식시킨 다음 배양 절편체를 포함하여 새로 형성된 측근을 무작위로 1~2cm로 절단하여 공기 부양형 풍선형 생물반응기에 접종한 다음 온도 22℃, 공기주입량 0.05~0.3vvm로 하고, 설탕 3%를 첨가한 MS 배지에 생장 조절제로서 BSAA(benzo [b] selenienyl acetic acid), IBA, NAA 중 1종을 1.0~10.0mg/L의 양으로 첨가하여 pH 6.0에서 배양하였다.

【보정대상항목】 식별번호 36

【보정방법】 정정

【보정내용】

표 1에서 알 수 있듯이 생장조절제를 처리하지 않은 배지에서는 2배 미만의 증가를 보이는데 비해서 IBA, NAA가 첨가된 배지에서는 5배 이상의 생체중 증가를 보였는데 2~3mg/L에서 가장 효과적인 결과를 나타내어 적정 농도임을 알 수 있었다. 한편 새로 합성된 오옥신인 BSAA를 첨가했을 경우에는 생체중이 현저히 증가하였고 그 적정 농도도 역시 2~3mg/L임을 알 수 있었다.

【보정대상항목】 식별번호 38

【보정방법】 정정

【보정내용】

따라서 생물반응기내에서 인삼 부정근을 대량 증식하기 위해서는 NAA, IBA, BSAA와 같은 생장조절제의 첨가하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다.

【보정대상항목】 식별번호 40

【보정방법】 정정

【보정내용】

생물 반응기에 산삼 및 재배삼의 부정근을 배양할 때 부정근의 조제 방법이 뿌리 증식에 미치는 영향을 규명하기 위하여 BSAA 2mg/L가 첨가된 MS 배지에 무절단 배양법, 절편체를 제외하고 측근만 배양하는 방법, 절편체 및 측근의 구분

없이 부정근의 길이를 1~2cm로 절단하여 배양하는 방법으로 구분하여 4주간 배양한 다음 그 결과를 표 2에 나타내었다.

【보정대상항목】 식별번호 46

【보정방법】 정정

【보정내용】

이 때 배양실의 온도는 22℃로 고정하였고 생물반응기 내 공기 주입량은 0.05~0.3vvm으로 하였으며, 배지는 설탕 3%를 첨가한 MS 배지를 사용하였고 생장 조절제로서 BSAA 2.0mg/L를 첨가하였고 pH는 6.0으로 조절하였다.

【보정대상항목】 청구항 1

【보정방법】 정정

【보정내용】

인삼, 장뇌삼, 산삼 중 어느 하나를 멸균 소독한 후 2~3mm의 절편으로 한 다음 2, 4-D(2,4-dichlorophenoxy acetic acid), Pichloram, NAA(naphthaleneacetic acid) 각각을 1.0~10.0mg/L의 양으로 첨가한 MS(Murashige-Skoog) 배지에 접종하고 캘러스를 유도하는 단계와,

상기 유도된 캘러스를 2,4-D를 0.1~5.0mg/L 첨가한 MS 배지에서 증식시킨 다음 2~4주 간격으로 계대 배양하면서 IBA, NAA중 어느 하나를 1.0~5.0mg/L의 양으로 첨가한 MS 배지에 옮겨 주며 부정근을 형성시키는 단계와,

상기 형성된 부정근을 MS 배지에서 증식시키는 단계와,

상기 증식시킨 부정근을 공기 부양형 풍선형 생물반응기에 접종하여 설탕 3%를 첨가한 MS 배지에 생장조절제로서 BSAA(benzo [b] selenienyl acetic acid) 1.0~10.0mg/L, IBA 1.0~10.0mg/L, NAA 1.0~10.0mg/L중 어느 하나를 첨가하여 배양하는 단계와,

상기 배양된 부정근을 더 큰 용량의 생물반응기로 스케일 업하여 대량 생산하는 단계로 구성되는 것을 특징으로 하는 조직 배양에 의한 인삼·장뇌삼·산삼 부정근의 대량 증식 방법.